嘉義地區柑橘木蝨消長及其傳播立枯病之研究

王麗媛[1]　洪士程[1]　林瓊玖[2]　洪挺軒[3]　蘇鴻基[3]

[1]台灣省農業試驗所嘉義分所植保系助理、助理研究員
[2]台灣省農業試驗所嘉義分所園藝系副研究員
[3]國立台灣大學植物病蟲害學研究所博士及教授

摘　要

柑橘木蝨為柑橘立枯病之媒介昆蟲，調查柑橘木蝨在田間之消長規律，顯示成蟲一年出現三個高峰期與柑橘之春芽、夏芽及秋芽期一致。其中以春芽期蟲數最多，夏芽期次之、秋芽期最少。若成蟲空間分布之變化以聚集度值為參考依據，則當新芽長出時，成蟲逐漸聚集產卵，聚集度指標往上攀升，當若蟲大量羽化為成蟲且尚未分散之際，聚集度值達最高峰，之後隨著成蟲的分散，聚集度值往下降。由田間設置黃色粘板誘蟲情形，確知柑橘木蝨飛翔最活躍的時期集中在柑橘新芽出現時，成蟲羽化後的分散則以植株內之爬行為主，並在老葉下停留吸食汁液，不太活躍。木蝨在柑橘園較大量之遷移以三月中旬以後至四月底較多，此段期間離柑橘園數百公尺遠之雜果園、水稻田皆可採到柑橘木蝨成蟲。當木蝨侵入柑橘園後可迅速繁殖並在果園四處分散。因此，三、四月木蝨侵入後若不防治，至八月時可在70％的植株上發現木蝨取食，故三至五月是防治木蝨的關鍵時期。以核酸探針配合點漬雜配法偵測植株，研究田間感染生態，立枯病於田間的發生是漸進的擴散方式，鄰近病株周圍的植株最早受感染但不呈現病徵。在田間，一些外表健康的植株其實已帶病原，而且潛伏期很長，需一年以上的時間才會出現病徵。在初受感染局部呈現病徵的罹病株，病原分布不平均，離感染點愈遠，病原含量愈少。整株呈現典型病徵的病株，根、莖、葉、花、果實均有病原分布，但分布量差異不大。病原濃度隨著季節不同會有變化，在春夏交替的五、六月及晚秋的十月是病原濃度的高峰期，冬季則病原濃度低。由核酸探針的偵測也證實柑橘木蝨的確是立枯病的媒介昆蟲，但蟲體個別的帶菌量、帶菌率都低，顯示台灣的柑橘木蝨生態種和立枯病原親和力差。但若讓木蝨族群長時間感染，仍有極高的發病率，而使植株嚴重罹病。

關鍵詞：柑橘立枯病、柑橘木蝨、族群消長、核酸探針。

前　言

柑橘立枯病由柑橘木蝨(*Diaphorina citri* kuwayama)傳播[16]，為一世界性的病害。在東南亞、中國大陸、台灣、印尼、菲律賓、印度、非洲及阿拉伯半島等柑橘產區都有此病害發生。但常因病徵不盡相同，而有不同的病名。1947年於南非首次發現，即因病株明顯矮化，產生果實小而畸型，皮厚、果肉、果汁少，果皮外部部分不能黃熟維持綠色，而稱之為綠化病(Greening)[2,24]。在台灣，1951年由松本巍教授首先發現，因病株葉脈及相鄰組織黃化，黃斑部分漸擴及整個葉片，病葉會變硬而向外彎曲，葉脈木栓化，導致提早落葉、梢枯，最後全株枯死，故稱為立枯病(Likubin)[18]。另外在中國大陸稱為黃龍病(Huanglungpin)、菲律

賓稱爲萎黃病（Leaf mottle yellows）、印尼稱爲柑橘葉脈韌皮部退化病（Citrus vein phloem degeneration）、印度稱爲柑橘梢枯病（Citrus dieback）[24]。1970年以後，柑橘立枯病在台灣再度嚴重發生，於中南部無數的柑橘園遭受感染，幾近廢耕[7]。麻豆地區的文旦柚也陸續產生立枯病病徵，原本以爲抗病的柚類植株亦開始得病，至此證實立枯病幾乎可危害台灣各類柑橘品種[2,6]。

對立枯病病因的探討，可追溯至1910年，當時認爲立枯病可能是環境因子引起或線蟲爲害所致，繼之則認爲立枯病可由蚜蟲媒介傳播，病原可能是病毒[7]。1967年因擬菌質體的發現，立枯病在1970－71年被認爲是由擬菌質體（Mycoplasma－like organism,MLO）所引起，但病株均有南非立枯病病毒（Tristeza）的存在[7]。之後，從立枯病株將擬菌質體與南非立枯病毒分開，則證實該病的主因爲擬菌質體[16]。1984年，南非的綠化病（Greening），證實病原爲一種較原始的革蘭氏陰性細菌（Gram－negative bacterium）[13]，稱爲擬細菌（Fast－idious bacteria）；台灣的立枯病病原亦是擬細菌，菌體爲多型性，寄生於維管束組織的篩管細胞中，新生的菌體較細長（100～250 x 500～2500nm），衰老後的菌體則呈球狀體（直徑約700～800nm）[17]。

南非綠化病（Greening）於1970年即證實由南非木蝨（*Trioza erytreae* Del Guercio）傳播[20]；印度的柑橘梢枯病及菲律賓的萎黃病由柑橘木蝨（*Diaphorina citri* kuwayama）傳播[7]，台灣的立枯病也是由柑橘木蝨傳播[16]。但木蝨傳播能力受木蝨生物小種影響頗大，台灣生物小種的傳播率低於1％[16]；在中國大陸，木蝨傳病能力則因地區不同而有差異[4]。柑橘木蝨族群的消長，以三～五月成蟲密度最高，一月下旬至三月間及五月的柑橘萌芽期爲木蝨重要繁殖期[8]； 而在月橘上柑橘木蝨之週年消長，同樣是三～五月成蟲密度最高，七月則密度較低[10]。但是木蝨族群在柑橘園的週年消長及遷移活動的情形仍未清楚。

立枯病在台灣發生已有四十餘年，直到目前，仍嚴重影響柑橘產業。由於病原無法培養，不容易分離，因此不易診斷。在法國，曾利用單元抗體（Monoclonal antibody）來診斷與偵測立枯病原[14]，但因病原在寄主植物中量少且分布不均，導致以酵素聯結抗體法（ELISA ）來偵測病原時，所得的數值低且不穩定，效果不彰。目前國內已開發出偵測立枯病原的核酸探針（DNA probe）[2]，其專一性及靈敏度高，可快速正確的偵測出病原。

清除病株，種植健康苗及消滅媒介昆蟲爲衆所週知的立枯病防治方法，但是唯有對病原、寄主植物與媒介昆蟲三者及其相關關係作通盤了解，方能適時有效防治。故本實驗即從調查柑橘木蝨在柑橘園週年的族群消長及遷移活動開始，再利用核酸探針作田間感染生態的偵測，探討健康苗於田間再感染的情形、立枯病原在病株的分布與四季消長及媒介昆蟲體內病原含量。以提供釐定防治方法的重要參考資料。

材料與方法

一媒介昆蟲之消長規律調查

生態環境穩定且木蝨週年發生之柑橘園木蝨族群消長調查

於嘉義縣竹崎鄉，選定一疏於管理、立枯病嚴重發生之柳橙果園（佔地0.3公頃、七年生柳橙80株）爲試驗園。於園中逢機選取20株，每株分別在四個不同方位選定一枝條，於枝條

前端20公分掛上標識牌作為調查點，每10天調查一次，記錄柑橘芽數、木蝨四、五齡若蟲數及成蟲數，作全年蟲數消長調查及分析聚集度之時序動態。另外於園中設置黃色粘板（10x12 cm）8片，離地面150公分高，週年定期調查所捕獲之木蝨成蟲數目，以了解木蝨飛翔及遷移活動情形。

二、田間之感染生態

(一)木蝨傳播病原的模擬生態實驗

1991年10月於嘉義分所選定一隔離之試驗地，約0.1公頃，將椪柑健康苗66株與經嫁接罹患立枯病之病株59株，以直行相鄰種植（圖1）。於園中釋放木蝨，令其孳生繁殖，在不施殺蟲劑情況下，進行自然感染。1993年4月始，觀察植株罹病情形，記錄病徵表現，同時選取生長勢較好，外表無病徵之健康株30株，每株採葉片50克，利用核酸探針以點漬雜配法（Dot Hybridization，DH）偵測有無病原反應。另於1993年6月、8月再進行病原偵測及記錄植株病徵表現。本試驗有關核酸探針點漬雜配法偵測之步驟參照洪挺軒1994[2]。

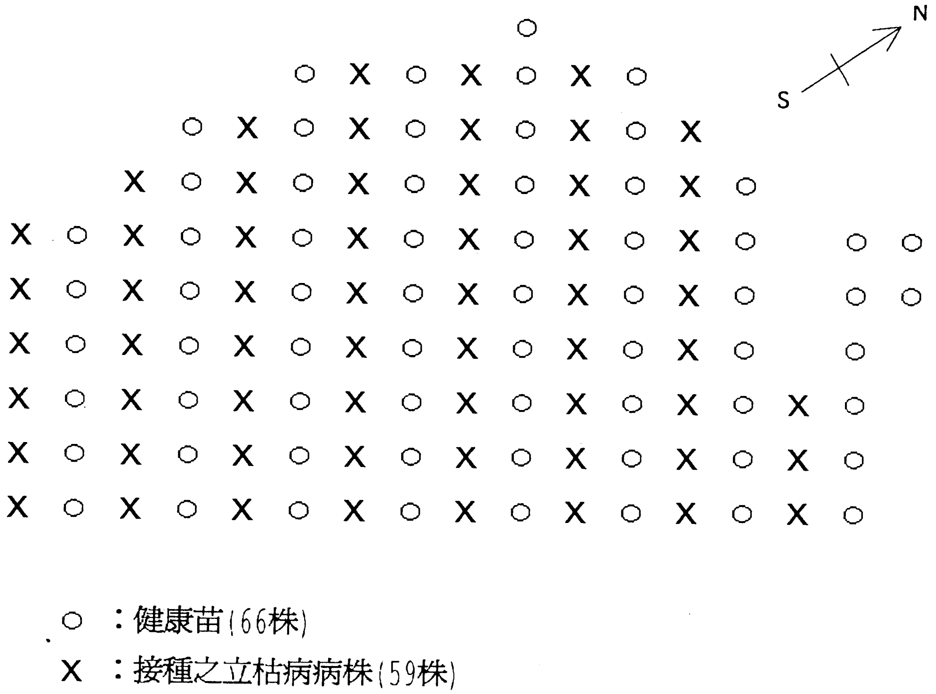


圖1. 立枯病病原傳播生態之田間試驗園定植圖（1991年10月定植）。

Fig. 1. Mapping of healthy citrus receptor seedlings and greening organism infected citrus donor seedlings in test plot for studing of transmis-sion ecology.

㈡木蝨遷移、侵入及增殖與立枯病在田間發生蔓延之關係

為了解木蝨侵入柑橘果園後族群之發展與立枯病發生之關係，於嘉義分所選定0.78公頃試驗園，種植椪柑健康苗240株（行株距1.8x1.8m、1990年11月定植），於1992年4月發現木蝨開始侵入，即以其周圍共100株（10x10），調查植株上木蝨若蟲、成蟲蟲數，並記錄植株病徵。植株有無病原反應則利用核酸探針以點漬雜配法偵測之。

三田間健康苗再感染之測定

於嘉義分所內之試驗園，椪柑健康苗採密植（行株距1.8x1.8m；0.09公頃、278株）方式，於定植2年半後（1990年11月至1993年5月）以第一株罹患立枯病之病株為中心，取其周圍共12株（3x4）之小方塊區域，每隔兩個月採葉片利用核酸探針以點漬雜配法偵測有無病原反應。於1993年11月及1994年4年則擴大偵測範圍，取100株（10x10）進行偵測並記錄植株病徵，以了解健康苗於田間再感染之情形。

四病原在寄主植物內之分布與病原濃度四季之變化

為了解立枯病原在病株內的分布，於田間已偵測過確定帶有病原且呈現典型病徵的椪柑病株中，選取兩株，採集不同成熟度之葉片。將位於植株下位且較硬較大的老葉，剛抽新梢的幼葉及完全伸展的成熟葉分別以核酸探針偵測病原含量。又同樣的植株再分別採樣5克的成熟葉、莖的剝皮、花與果皮，並以同重量之葉片中肋作為偵測訊號強度之參考，經同樣處理後進行病原的偵測。另外挖取五株椪柑病株根部偵測病原含量。

對於只有局部呈現病徵的罹病株，病原在不同部位分布的情形，選取兩株剛出現病徵的椪柑病株，採樣有病徵的葉片，而沒有病徵的葉片則就其距離有病徵枝葉之遠近分別採樣偵測。對於已發病很久的老病株，雖然病徵穩定沒有明顯變化，但在不同季節測得的病原訊號強弱不同，因此推論病原在寄主中病原濃度可能隨著季節不同會有變化。為證實之，於不同地區的田間（嘉義、埔尾）選取兩株已發病一年以上病徵穩定的立枯病株，自1992年5月起每個月定期定量採樣，每月抽取的核酸先保存於－80℃，待收集到12個月後一起做偵測。偵測時每個核酸樣本皆作1/2濃度系列稀釋，而以可偵測到的病原稀釋終點濃度作為病原含量之參考指標。

五媒介昆蟲木蝨體內病原之偵測

於竹崎鄉進行木蝨消長調查之柳橙試驗園，採集病株上的木蝨共400隻，攜回後逢機取樣區分為六組，每組之蟲數分別為200、50、25、10、5、1隻，每組進行病原核酸之抽取，再利用核酸探針以點漬雜配法偵測之。於健康苗再感染試驗區，就四株病徵明顯之病株（兩株椪柑、兩株葡萄柚），每一病株上採集木蝨50隻，連同病株的枝葉分別偵測是否有病原。另外再於椪柑病株上採集木蝨共300隻，分成三群，每群100隻；第一群以5隻為一組共20組、第二群以10隻為一組共10組、第三群以25隻為一組共4組，在提高病原核酸濃度之處理後[2]，將不同蟲數進行多次偵測，以了解木蝨體內病原含量及核酸探針偵測木蝨之靈敏度。有關木蝨蟲體處理、病原核酸抽取及點漬雜配法之詳細步驟參照洪挺軒1994[2]。

結　果

一、媒介昆蟲之消長規律調查

生態環境穩定且週年發生木蝨危害之柑橘園木蝨族群消長情形調查

柑橘木蝨在生態環境穩定之果園，族群消長情形如圖2，全年皆有成蟲取食危害，木蝨成蟲一年出現三個高峰，分別爲四月初、七月初、及十一月初，與柑橘之春芽、夏芽、秋芽期一致，其中春芽期最多，其次爲夏芽期，秋芽期最少，木蝨之繁殖期主要在這三個時期，其餘時間若無嫩芽，則成蟲在老葉下吸食汁液。

柑橘木蝨之空間變動情形，以聚集度值（m* / m）作爲指標，其時序動態如圖3，當聚集度值愈接近1表示愈趨近逢機分佈，值愈高表示個體愈聚集，由圖3可將聚集度之變化歸納爲兩種情況：其一，當新芽長出時，成蟲逐漸聚集產卵，使聚集度指標往上攀升，如1992年2月3日、6月3日、8月23日、12月13日及1993年1月23日、3月23日之發展。其二、當若蟲大量羽化爲成蟲且尚未分散之際，聚集度值達最高峰，當成蟲開始分散，聚集度值便急劇下降，如1992年2月14日、4月2日、7月13日、9月23日及10月23日之情形。

竹崎鄉柳橙園，以黃色黏蟲板誘集木蝨成蟲之誘集結果如圖4，以3－5月捕獲蟲數最多，誘集量之高峰出現在成蟲羽化高峰前20－30天，成蟲受黃色粘板誘集之高峰恰爲成蟲飛翔聚集芽上產卵之時期。

二、田間之感染生態

(一)木蝨傳播病原的模擬生態實驗

於嘉義分所一隔離試驗地，將健康苗與立枯病株以直行相鄰種植，於園中釋放木蝨，令其孳生繁殖，在不施殺蟲劑情況下，進行自然感染。經一年半的傳播時間後（1991年10月至1993 年4月），選取30株生長勢較好，外表無病徵之健康植株，偵測有無病原存在。結果發現受測之30株無病徵，看來健康的植株，已有27株有病原反應，感染率高達90%。再經兩個月（1993 年6月），進行第二次偵測，原來無病徵反應之3株，已能偵測到病原，即感染率已達100％。換言之，於木蝨族群高之模擬生態中，椪柑健康株於種植20個月後，全部感染立枯病。由以上結果與病徵觀察記錄綜觀之（表1），在第二次採樣偵測時，30株原無病徵之椪柑株中，有一株病徵明顯，8株剛開始出現病徵，發病率爲30％（9 / 30）。而再經過兩個月（1993年8月）觀察病徵時，則全部植株都已呈現嚴重病徵，發病率高達100％（30 / 30）。換言之，在傳播試驗進行22個月後，全部的實驗株都已發病。

(二)木蝨遷移、侵入及增殖與立枯病在田間發生蔓延之關係

1990年11月定植於嘉義分所之椪柑健康苗，於1992年4月發現有木蝨侵入，調查100株椪柑植株，可於8株植株上找到木蝨若蟲或成蟲，有蟲株率爲8％，於同年7月則73％的椪柑植株上有木蝨之若蟲或成蟲（圖5.A－D）。由此知，柑橘木蝨侵入果園後之發展趨勢，自三、四月侵入後，於短時間內可大量繁殖並分散到果園各處，可見擴散速度很快。又由木蝨成蟲數量變化與有蟲株率之變化情形來看（圖6），木蝨成蟲蟲數之增加以春芽期最多，夏芽期蟲數没有明顯增加，然木蝨蟲口數受芽期之限制，田間蟲數第一代在5月15日出現高峰，數量較多；第二代則在夏芽出現後之7月5日出現高峰。而植株有蟲的比率，四月份爲8％，至7月份則增至73％。由此表示，蟲量的增加主要是春芽期木蝨之繁殖，而有蟲株率之增加主要靠成蟲之分散。而以核酸探針偵測的結果（圖5.E），82株的植株含有病原，感染率爲89％（82 / 92），發病率爲70％（62 / 92）。可見木蝨侵入後在不防治的情況下感染情形非常嚴重。

表 1. 立枯病田間傳播試驗之病原偵測與病徵記錄。

Table 1. Detection of Greening organism and symptom development of test citrus plants in test plot.

Planting date:1991 / 10

Plant No.	1993 / 4		1993 / 6		1993 / 8
	DNA Probe test	symptom	DNA Probe test	symptom	symptom
1	+ + + (a)	H (b)	+ + + +	H	M
2	+ + + +	H	+ + + +	I	S
3	+ +	H	+ + +	M	M
4	+ +	H	+ + + +	H	I
5	+	H	+ + +	H	M
6	+ +	H	+ + + +	H	M
7	+	H	+ +	H	M
8	+	H	+ +	H	S
9	+ +	H	+ + +	M	I
10	+ +	H	+ + +	H	S
11	+	H	+ +	H	I
12	+ / -	H	+	H	I
13	+ / -	H	+	H	I
14	+	H	+ +	H	I
15	-	H	+ / -	H	M
16	-	H	+ / -	H	M
17	+ +	H	+ + +	M	S
18	+	H	+ +	M	I
19	-	H	+ / -	H	M
20	+	H	+ +	H	S
21	+ + +	H	+ + +	M	M
22	+ +	H	+ + +	M	M
23	+ + +	H	+ + + +	H	I
24	+ + +	H	+ + + +	M	S
25	+ + +	H	+ + + +	H	M
26	+ / -	H	+ +	H	I
27	+	H	+ +	H	I
28	+ +	H	+ + +	H	I
29	+ + +	H	+ + + +	M	I
30	+	H	+ +	H	M

(a) Signal of dot hybridization. Signal index: - ,no signal; + / - ,very weak signal; +,weak signal; + +, intermediate signal; + + +,strong signal; + + + +,very strong signal.

(b) Symptom of citrus likubin:H,healthy looking;M,mild symptom;I,intermediate symtpom; S,severe symptom.

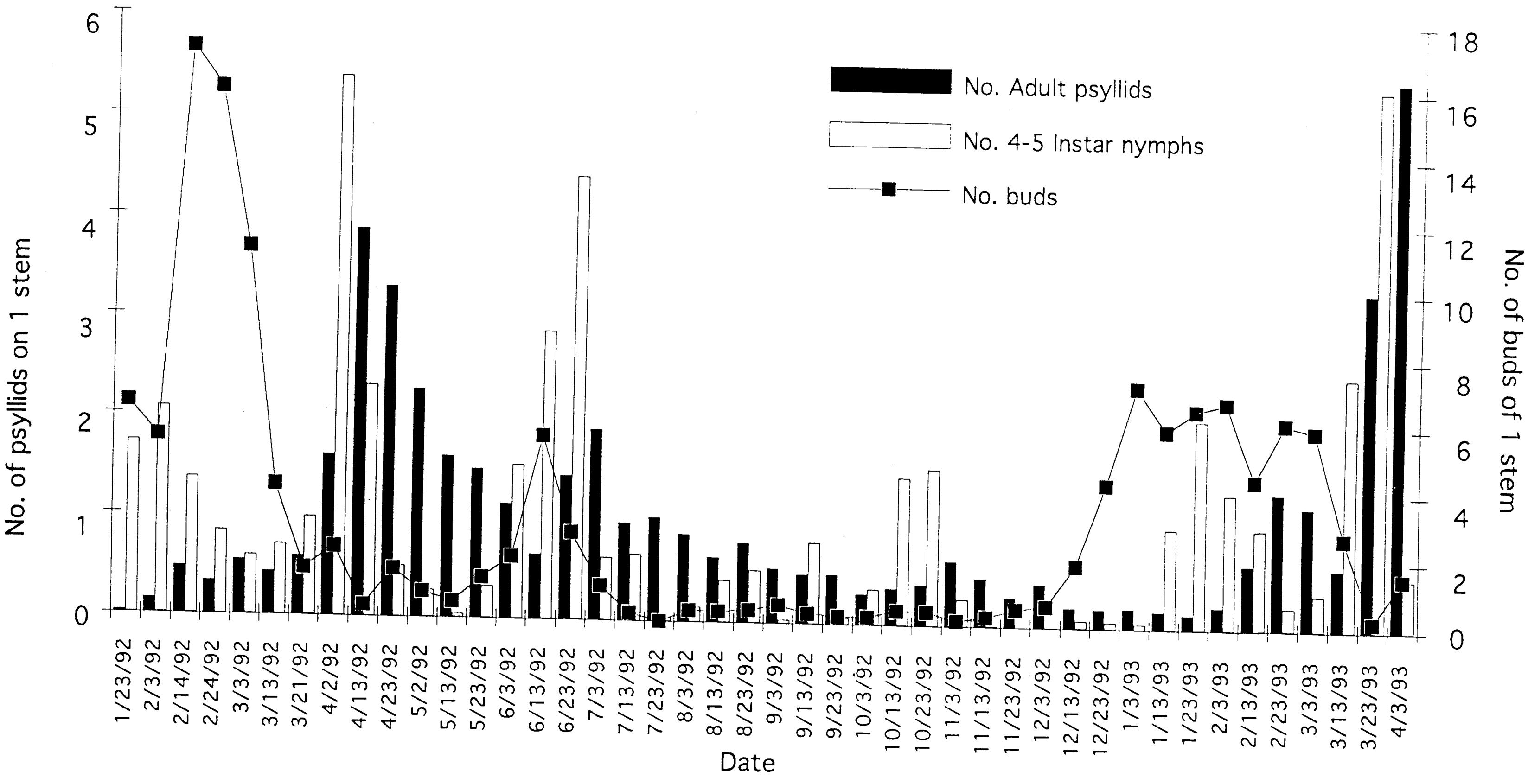


圖 2.1992－1993年，竹崎鄉一柑橘園內柑橘木蝨在柳橙植株上之消長。

Fig. 2. The density fluctuation of *Diaphorina citri* on Liucheng plants in a citrus orchard at Chu－chi from 1992 to 1993.

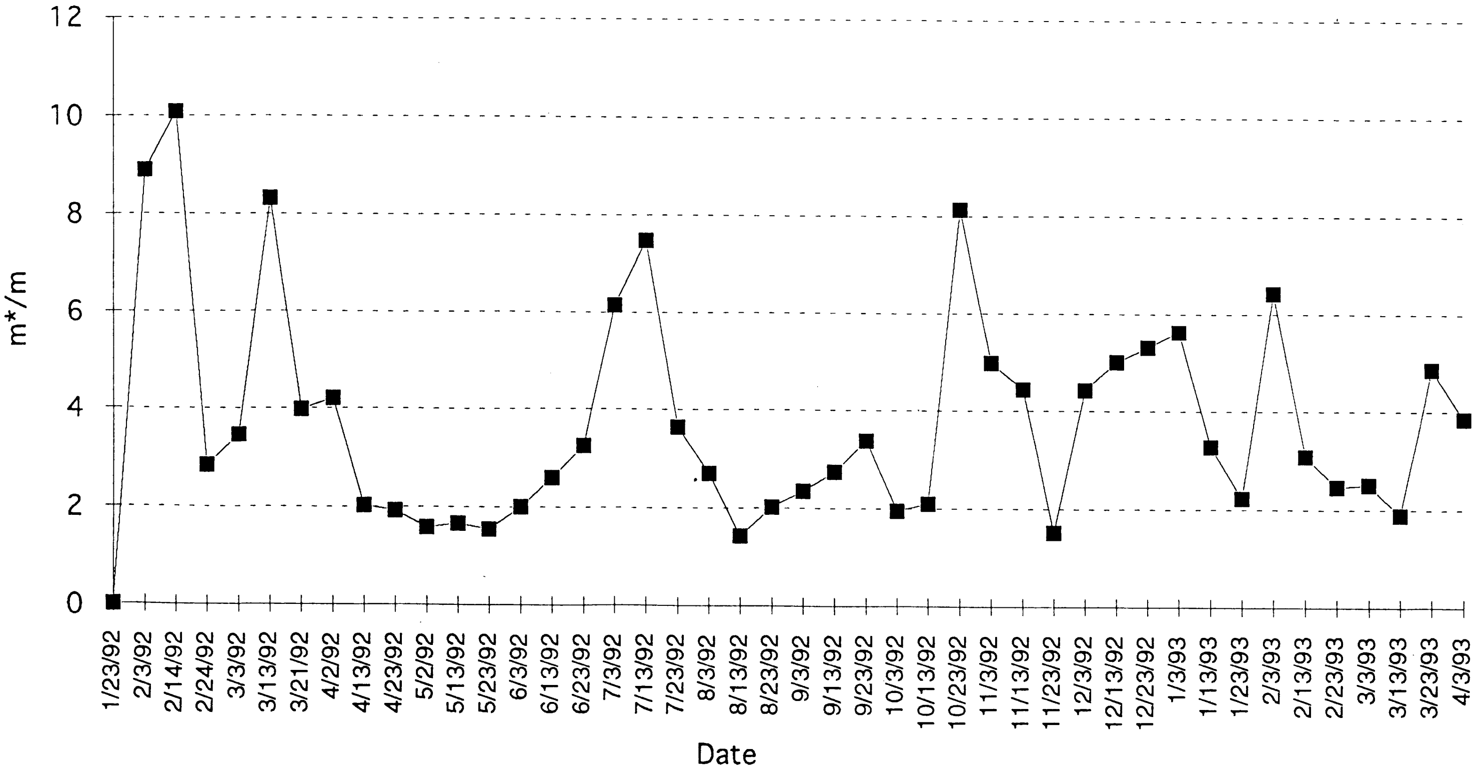


圖3.1992－1993柑橘木蝨在竹崎鄉一柳橙果園內自然種群聚集度（m* / m）之時序動態。

Fig. 3. Relative degree of agreegation of *Diaphorina citri* adult in a Liucheng orchard at Chu Chi from 1992 to 1993.

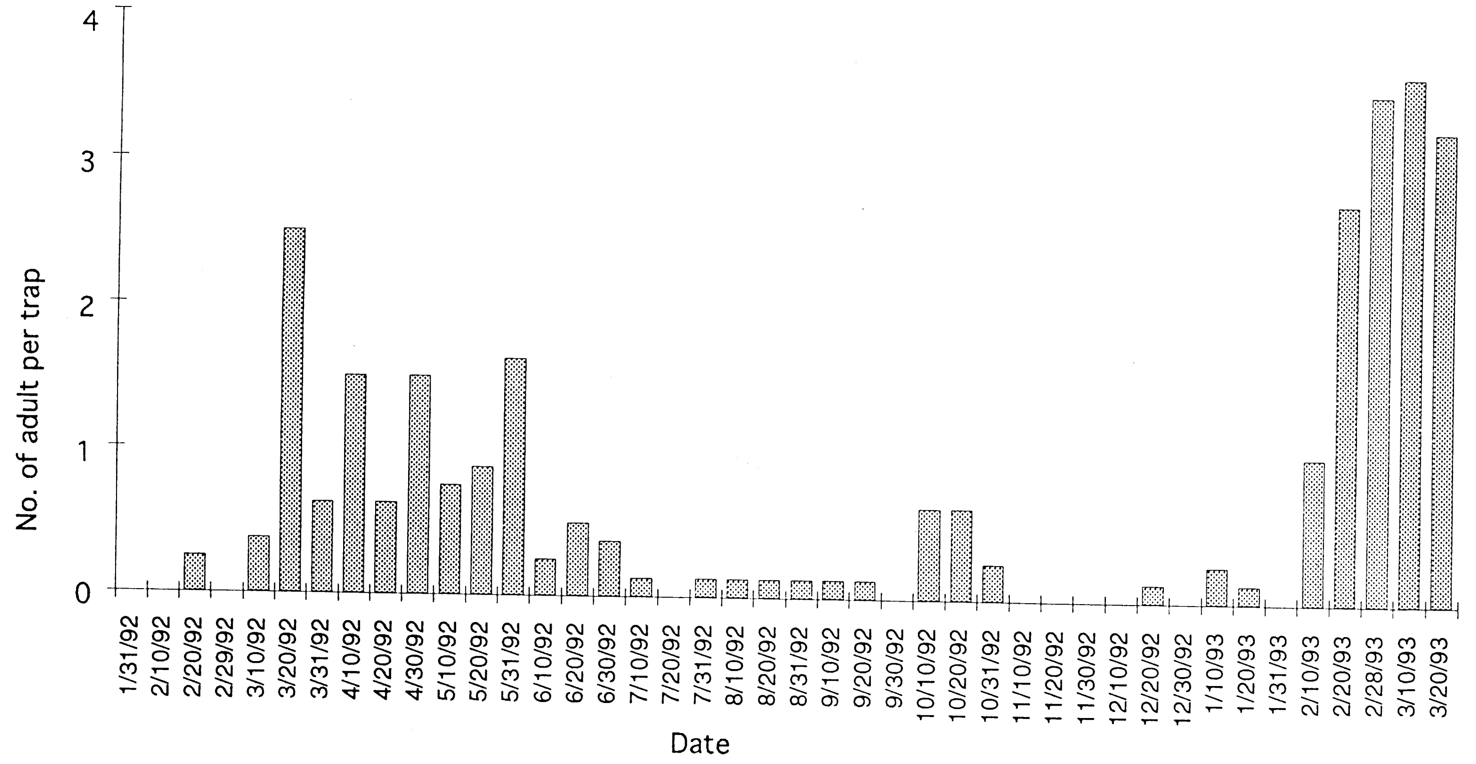
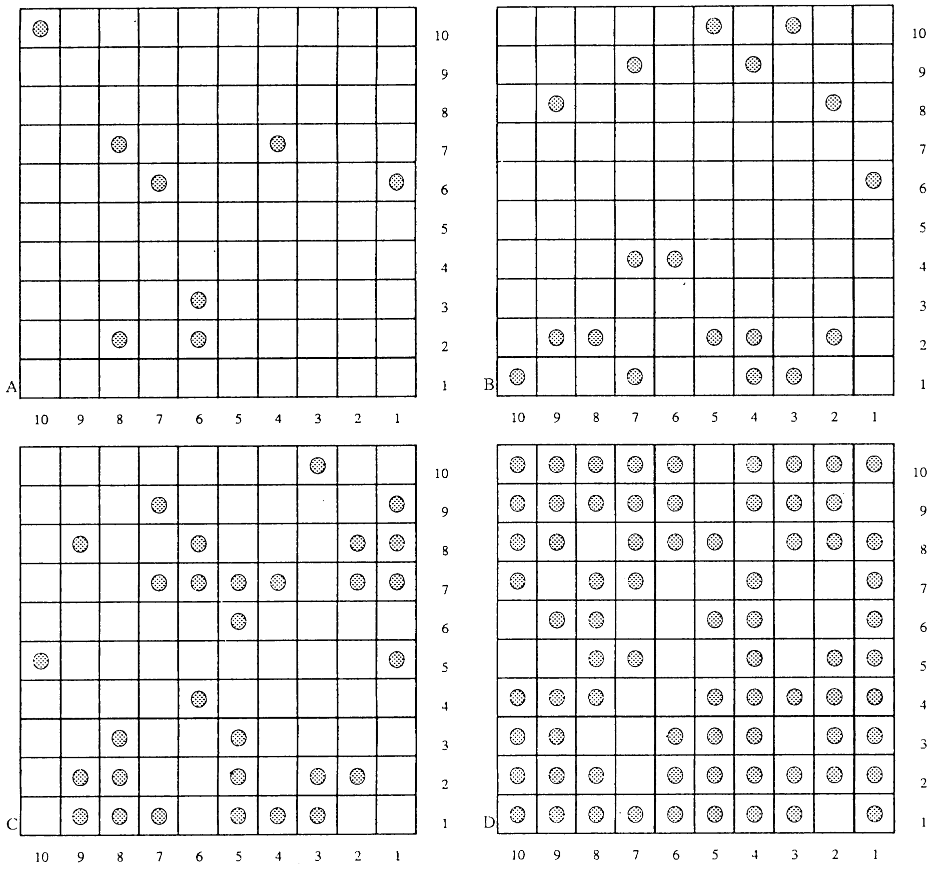
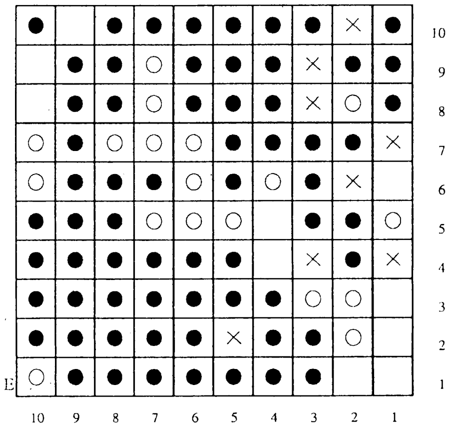


圖 4. 竹崎鄉柳橙果園黃色黏板誘集之柑橘木蝨成蟲誘集情形。

Fig. 4. Variation of citrus psylla caught on yellow sticky traps in a Liucheng orchard at Chu－chi from January 20, 1992 to March 20, 1993.



A: 1992 年4月25日柑橘木蝨發生情形
B: 1992 年5月25日柑橘木蝨發生情形
C: 1992 年6月25日柑橘木蝨發生情形
D: 1992 年7月25日柑橘木蝨發生情形
○ 表示有木蝨之植株



E: 1994 年4月核酸探針偵測椪柑植株
●表示已測到有病原且已呈現病徵
○表示已測到有病原但未發病者
×表示缺株

圖 5. 木蝨遷移、侵入及增殖與黃龍病在田間發生蔓延之關係。

Fig. 5. Immigration, migration and multiplication of *Diaphorina citri* in relation to incidence and spread of likubin in the citrus field at Chia-Yi station from 1991 to 1994.

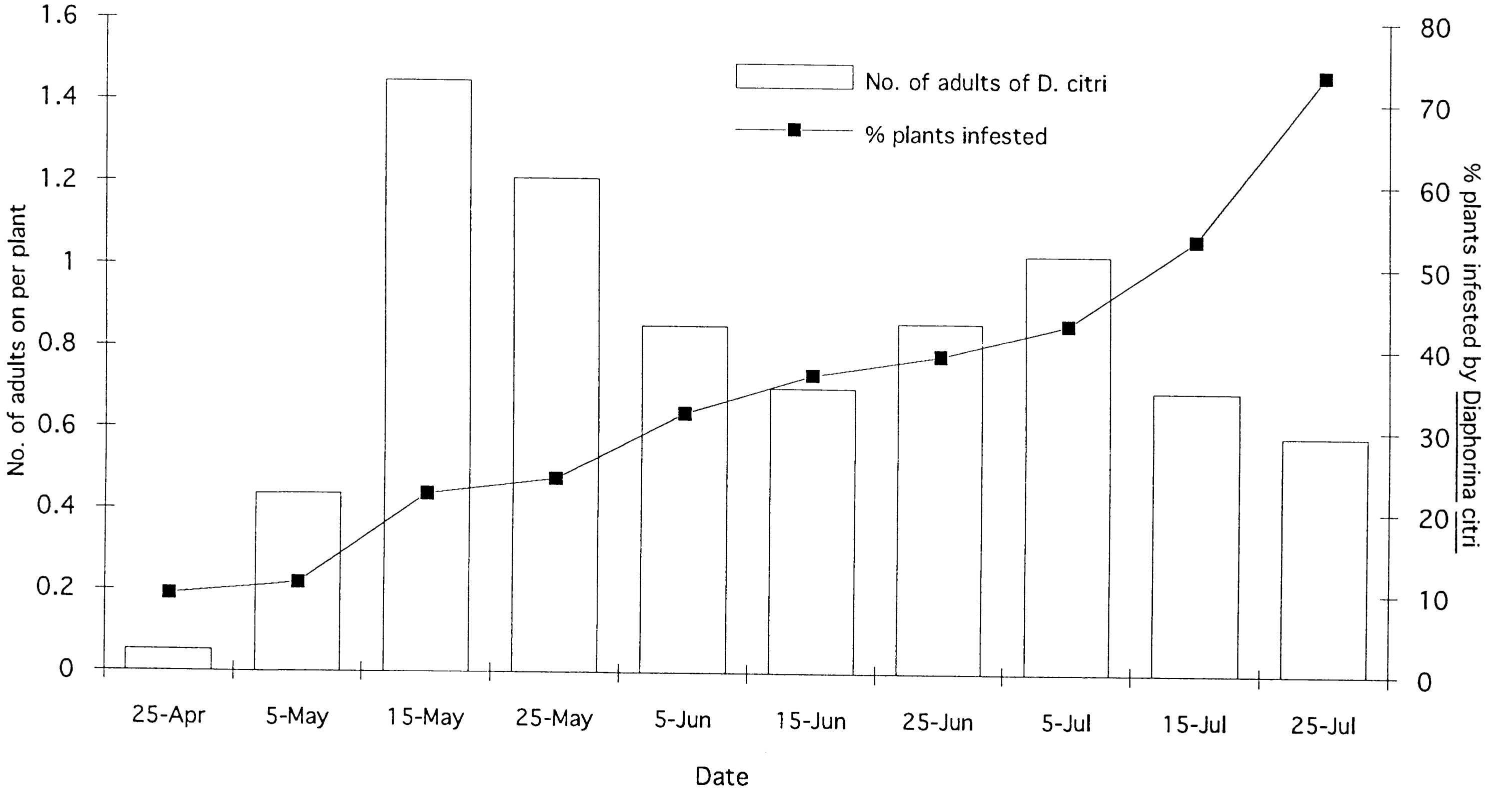


圖6. 嘉義分所椪柑果園受木蝨侵入後之蔓延情形。

Fig. 6. Migration and spread of *Diaphorina citri* in a ponkan orchard at Chia－Yi Station from April 25, 1993 to July 25, 1993.

三、田間健康苗再感染之測定

椪柑健康苗採密植，於定植2年半後（1990年11月至1993年5月），發現有一株罹患立枯病，以此病株爲中心，取其周圍共12株（3x4）之小方塊區域，每隔兩個月採樣偵測植株有無病原反應並記錄病徵表現，七次偵測結果及病徵記錄以感染率及發病率曲線圖表示之（圖7）。由圖中知，每次偵測之感染率都比發病率高，此即表示，初受感染植株需經過一段長的潛伏期才會出現病徵。於1993年11月以100株（10x10）爲偵測範圍，除了8個缺株外共偵測92株，偵測結果與核酸探針呈正反應者44株，即感染率爲48％（44 / 92），而有病徵的植株18株，即發病率爲20％（18 / 92），未出現病徵的帶病株26株（圖8.A）。1994年4月進行第二次偵測，感染率爲80％（73 / 91），較第一次偵測時感染率上升了32％；有病徵的植株30株，發病率33％（30 / 91），較第一次偵測時上升了13％（圖8.B）。比較兩次偵測的結果，第一次偵測時，受感染的植株多位在每一行的後半段（自第六列始），而在第二次偵測時，病原才擴散至前半段，由此證明立枯病的病害發展模式屬於漸進的擴散方式。

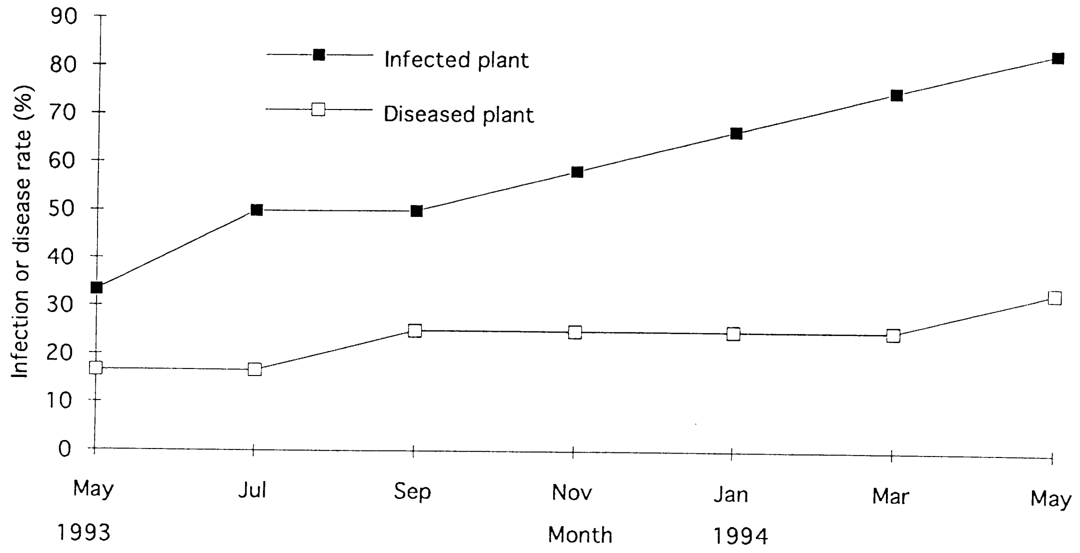


圖7. 田間健康苗再感染立枯病之感染率與發病率。

Fig. 7. Reinfection and disease development of likubin in healthy ponkan trees at.

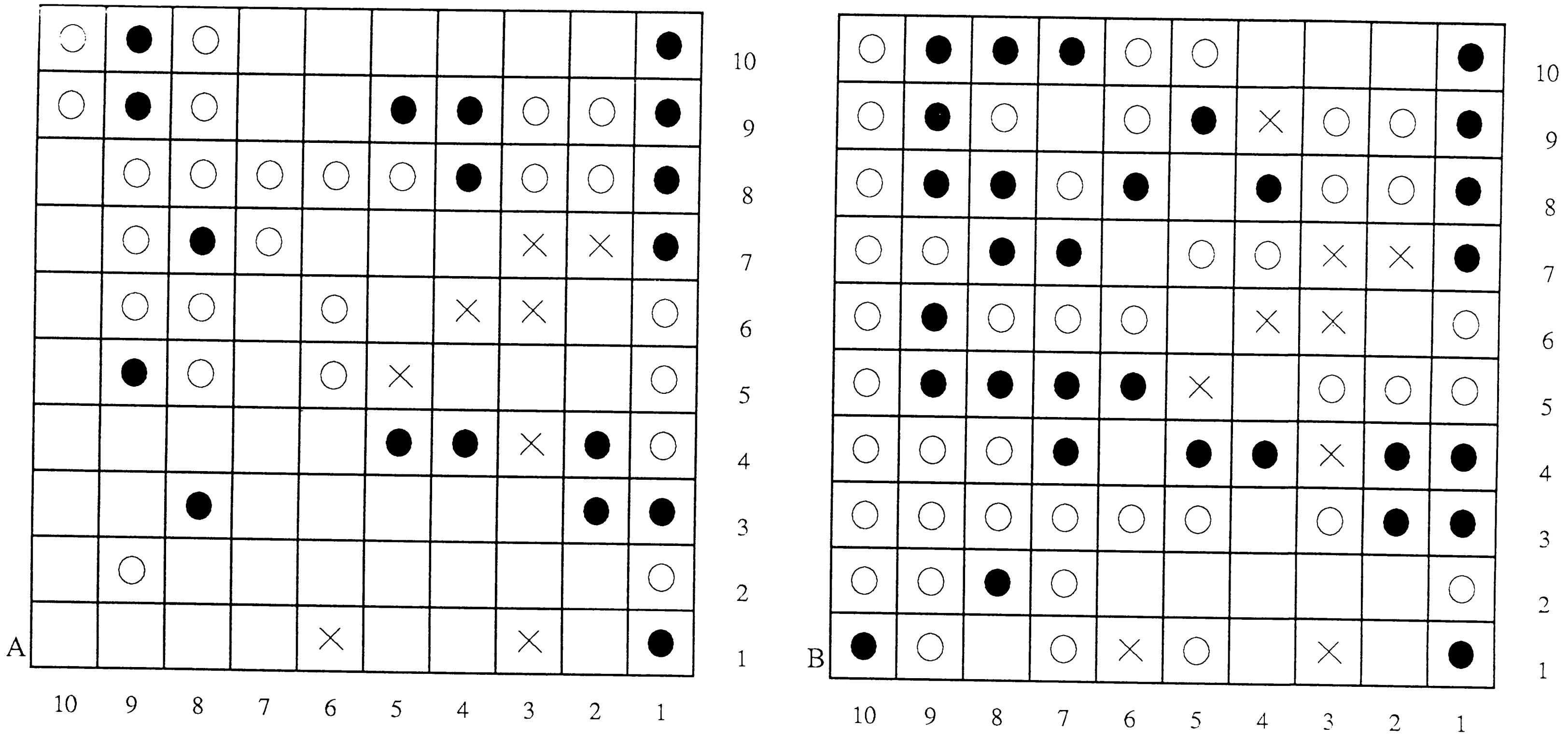


圖8. 以點漬雜配法檢測田間健康苗再感染立枯病之情形。

Fig. 8. Reinfection and disease spread of likubin at Chiayi test orchard detected by Dot Hybridization test in November, 1993 and April, 1994.

A：1993年11月檢測

B：1994年 4月檢測

● 表示已測到有病原且已呈現病徵

○ 表示已測到有病原但未呈現病徵

× 表示缺株

四病原在寄主植物內之分布與病原濃度四季之變化

於椪柑病株採取不同成熟度的葉片，以核酸探針偵測的結果，老葉、成熟葉與幼葉三者的偵測訊號強度無太大差異，訊號皆強，只能約略看出成熟葉訊號最強、老葉次之、幼葉訊號最弱（圖9. I）。表示病原在三種不同成熟度葉片內分布差別不大。對於病原在葉片、莖、花與果皮等部份之分布情形，以偵測訊號強弱來推論病原在各器官的分布量（圖9. II），以花的病原分布最多，依次為莖（皮）、葉，果實中病原分布最少。而病原在根部分布之情況，於田間挖取五株椪柑病株，取其根部偵測之。除了一株訊號較微弱外，其餘四株皆有明顯偵測訊號（圖9. III），可見立枯病原亦普遍分布在寄主植物的根部。

對於剛呈現病徵的病株，選取兩株分別採樣有病徵的葉片、而沒有病徵的葉片則就其距離有病徵枝葉之遠近分別採樣。病原偵測的結果顯示（圖9. IV），在呈現局部病徵的病株中，病原的分布不平均。有病徵的發病處，病原偵測訊號最強，沒有病徵的枝葉，偵測訊號較弱，而以距離發病處最遠者偵測訊號最弱，甚至有一株上面已測不到病原。由此顯示，在有病徵的葉片中，病原聚集較多，而在局部被感染的情況下，因病原在寄主內之移動速率慢，會造成病原分布不均，愈靠近感染點的病原濃度將愈高。而病原濃度在寄主內四季之變化，由偵測病原稀釋終點濃度訊號強度顯示（圖10），在12個月的期間內，各月所得的偵測訊號強度的確有起伏變化，將偵測兩個病株的結果製成曲線圖（圖11），發現在兩個病株所獲得的曲線皆有高低的變動，因而可知寄主植物內的立枯病原濃度會隨季節而有所變化。而且比較圖中兩條曲線，雖然兩病株採自不同地區（埔尾、嘉義），但病原在寄主植物內四季之變化情形是一致的。由圖中可知，病原在寄主植物內一年之中各出現兩次高峰期，一次大約在五至六月間，另一次在十月左右；而八月及二月左右為病原濃度低的時期。

五媒介昆蟲體內病原之偵測

由罹患立枯病之柳橙植株上採集木蝨400隻，依不同蟲數區分為六組，偵測病原含量之結果，必須50隻以上木蝨才能偵測到病原。又另於四株病株（兩株椪柑、兩株葡萄柚）上採集木蝨各50隻，連同病株枝葉一起偵測的結果（圖12. I），四株病株上的木蝨及四株病株的枝葉都含有病原。為了解木蝨體內病原含量及以核酸探針偵測之靈敏度，再於椪柑病株上採集300隻木蝨，分成三群，每群100隻，第一群以5隻為一組共20組、第二群以10隻為一組共10 組、第三群以25隻為一組共4組，在提高病原核酸濃度之偵測結果（圖12. II），5隻為一組的20組都未偵測到病原，以10隻為一組的其中一組可偵測到病原，而以25隻為一組的，4組皆可偵測到病原。綜合以上的結果可知，欲偵測木蝨體內是否含有立枯病原，則必須每次採集25隻以上木蝨，方能有效的偵測到。由此也證實木蝨體內有立枯病原存在，木蝨確實是立枯病的媒介昆蟲。

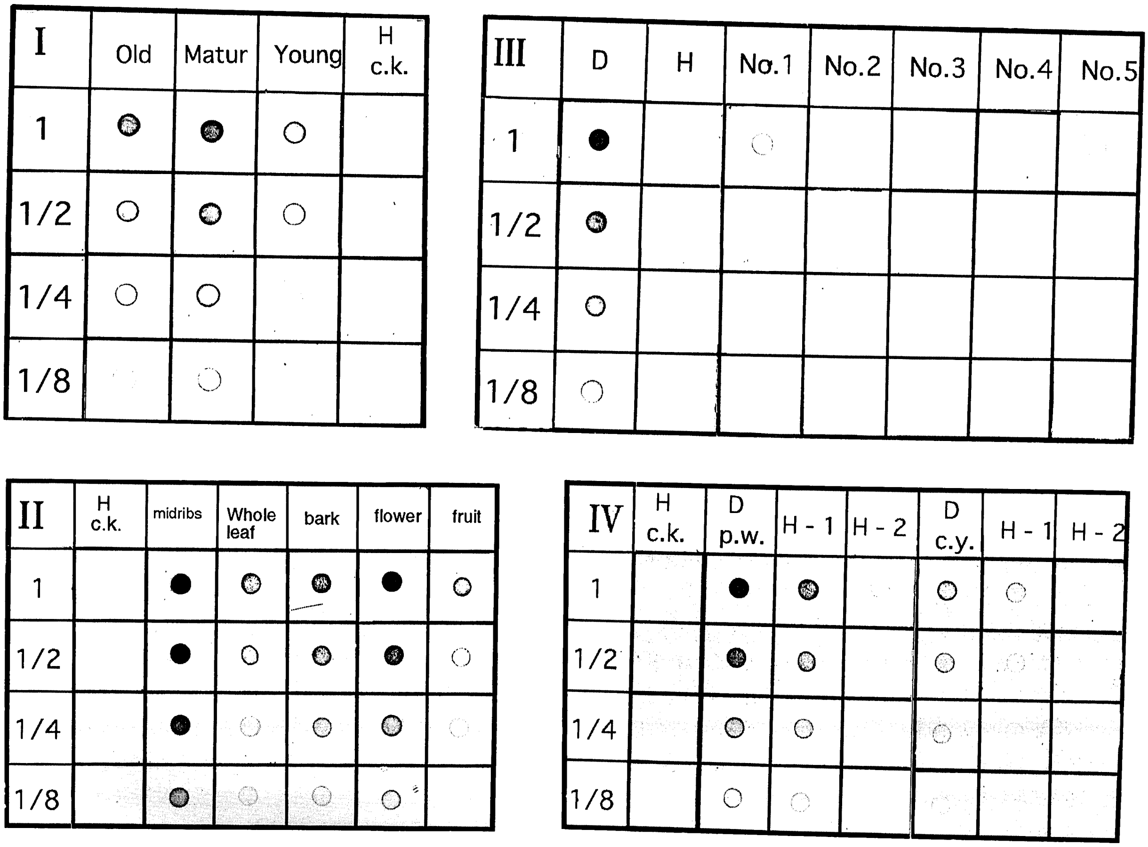


圖9. 以核酸探針應用點漬雜配法偵測立枯病病原在病株分布之差異。

I 病原在老葉、成熟葉、幼葉之分布

II 病原在莖、葉、花、果實之分布葉片中肋 (midribs) 爲偵測訊號強度參考

III 病原在5個病株根部之分布

IV 病原在局部呈現病徵之病株分布

H－1；H－2: 分別表距離有病徵感染點較近、較遠之葉片材料

H；H(c.k.): 健康材料對照組

D；D(p.w.)、D(c.y.): 正反應之對照組

1－1/8: 核酸樣本作1/2濃度系列稀釋

Fig. 9. Distributoin of greening organism in the tissues of infected plant detected by Dot Hybridization with DNA probe.

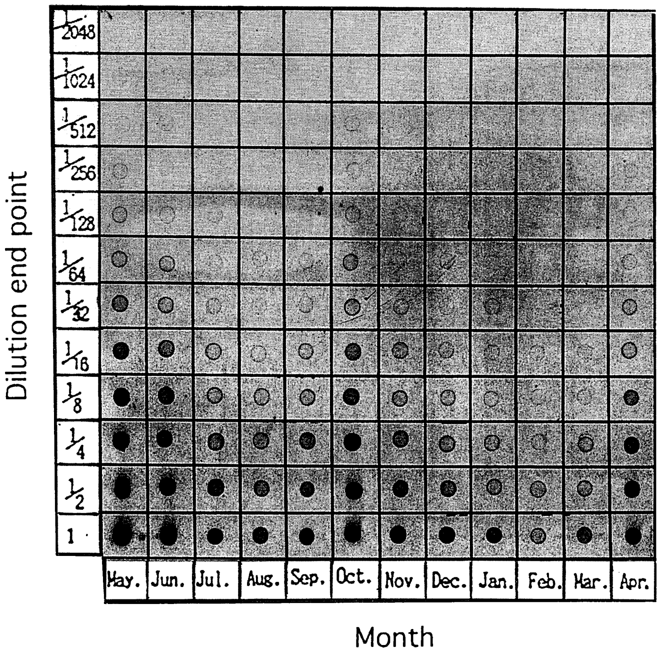


圖 10. 以核酸探針應用點漬雜配法偵測立枯病病原在寄主植物內四季之變動情形。

Fig. 10. Seasonal variation of greening organism in host plants detected by Dot Hybridization with DNA probe.

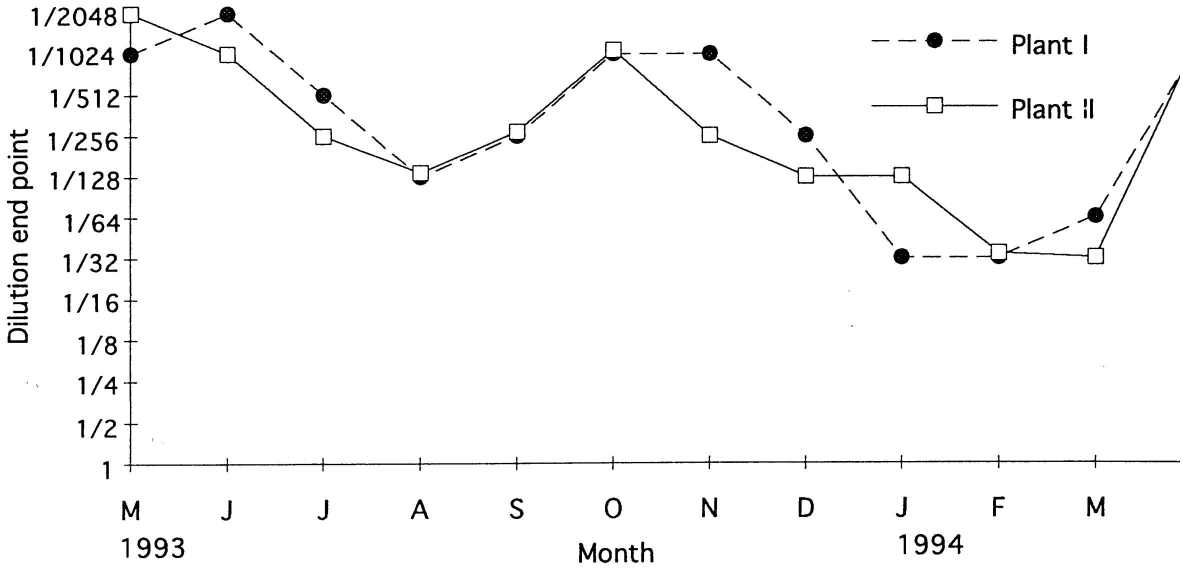


圖 11. 病原濃度在兩寄主植物內四季變化情形。

Fig. 11. Seasonal variation of the density of greening organism in two different diseased plants.

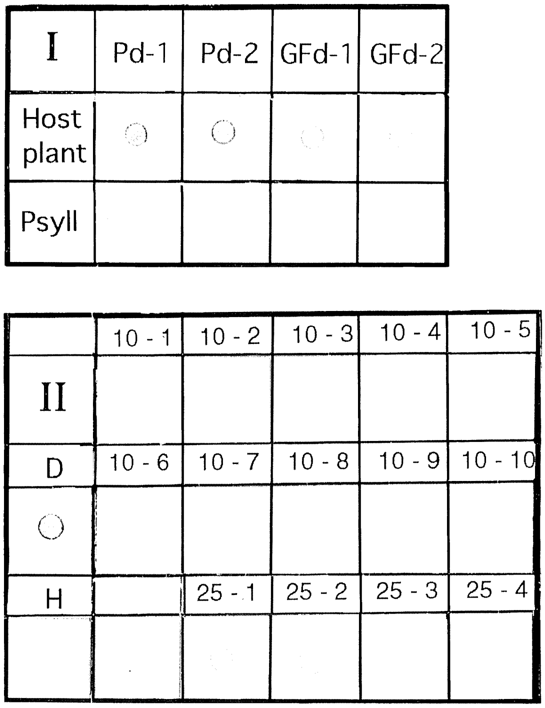


圖 12. 核酸探針配合點漬雜配法偵測木蝨體內立枯病病原。

Ⅰ. 木蝨蟲體及其寄主植物

Pd－1～2: 採自試驗園之兩椪柑病株

Gd－1～2: 採自試驗園之兩葡萄柚病株

Ⅱ. 核酸探針偵測之靈敏度

10－1～10－10: 以 10 隻木蝨爲一組進行偵測

25－1～2－4: 以 25 隻木蝨爲一組進行偵測

D: 病原正反應對照組，核酸樣本爲罹病椪柑

H: 病原負反應對照組，核酸樣本爲健康椪柑

Fig. 12. Dot Hybridization test with DNA probe for detecting greening organism in psyl－lids.

討　　論

由嘉義地區柑橘木蝨在田間消長規律之調查結果發現，木蝨各蟲態於三～五月間，即春芽期出現高峰，六月以後均趨於低潮，雖在八月間卵數略有回升，但延續期限很短；此與過去在溫室內或台灣中、北部及中國大陸浙江、湖南等地區的調查結果均類似(3,8,9,10,16)。故無論在溫室或田間木蝨的消長均受芽期限制，因芽期爲木蝨取食繁殖的時期。由此認爲三～五月是防治木蝨的關鍵時期。但冬季及早春的溫度高低，越冬蟲口基數的多少，均對高峰期的發生有所影響，故更須密切注意二～三月間春梢萌發時的蟲口動態，及早著手防治，以控制第一代木蝨的危害。

由田間設置的黃色誘蟲板誘集的蟲數與植株上成蟲數目之關係顯示，三～五月捕獲蟲數最多表示在柑橘新芽出現時，柑橘木蝨飛翔活動最活躍，可能新芽分泌某些誘引物質吸引成蟲聚集交尾產卵，而成蟲羽化後的分散則以植株內之爬行活動爲主。同時在這段期間，於附近的水稻田及雜果園內皆可捕獲柑橘木蝨。南非木蝨可遷移數百公尺以找尋新芽(23)，可能藉著氣流柑橘木蝨亦可作較遠的遷移行爲。

柑橘立枯病的檢定一般是以嫁接指示植物椪柑，約4－6個月後觀察病徵以鑑定之(16,19,22)。但常因耗時過久而延誤試驗或防治工作。利用核酸探針快速正確的偵測，使得其他因子引起的疑似立枯病株或已感染未呈現病徵的病株都得以澄清。也由此得以明瞭立枯病在田間發展的模式及木蝨在田間發生蔓延與立枯病發展的關係。由定期檢測田間健康苗再感染的情形得知，立枯病在田間以一種漸進的方式由病株向鄰近植株逐漸感染，亦即立枯病的發展模式爲擴散式的感染，愈接近病株的健康植株愈容易受感染，而且其擴散有方向性，並非向四周均勻擴散。又觀察木蝨遷移、侵入及增殖與立枯病在田間發生蔓延關係之試驗園，發現病害發展是由東偏北的方向逐漸擴散感染，這可能與木蝨高峰期的風向及木蝨族群移動的習性有關。木蝨不喜歡長距離的飛行(1,11,12)，因此由鄰近植株先予傳染，而風力與風向提供一個助力，使木蝨族群隨著風自然地向一個方向逐漸擴展，於是病原也隨之傳播開來。

柑橘立枯病的媒介昆蟲已證實爲柑橘木蝨(16,21)，但其傳播能力極低(16)，將飼養的柑橘木蝨，於每一椪柑植株上釋放15－20隻吸食二個月，經四次的試驗，於12－17供試株，都只有一株罹病(16)。本實驗以核酸探針偵測蟲體，單隻柑橘木蝨無法偵測到病原，需25隻以上的木蝨才含有足夠供偵測的病原量。可見立枯病原和柑橘木蝨的親和性不高。在台灣，柑橘木蝨不是一個高效率的媒介昆蟲。然而柑橘爲多年生果樹，植株長期暴露在田間，若讓木蝨終年寄生，植株必然感染立枯病。尤其當田間本來既有感染源存在，又值木蝨族群密度高時，植株受感染的情形將非常嚴重。在以木蝨傳播病原的田間模擬生態實驗中，即證實了這一點；在病株與健株幾乎一樣多，又有許多木蝨存在的田間，不到二年的時間，全部健株嚴重罹病，傳播速度之快，異常驚人。由此可見，媒介昆蟲的防治與田間病株的清除在立枯病的防治上非常重要。

田間病株爲立枯病的主要感染源，利用核酸探針偵測追蹤更是發現有許多外表健康的植株其實是已帶有病原的病株。許多植株在測到有病原以後，已超過一年的時間尚未產生病徵，可見潛伏期很長。就一剛呈現病徵的病株而言，病原在植株內的分布是很不平均的，沒有病徵的部分甚至測不到病原。黃氏於1979年切取病株不同部位組織嫁接於椪柑苗上，即獲知初期感

染的椪柑株，病原在整個植株的分布不均[5]，此與目前核酸探針偵測的結果相符。據推測，可能因病原寄生在篩管組織，移動時需經由篩孔，而菌體不似病毒般微小，故移動速度緩慢，但仍會漸漸的擴及其他部位，直到全株呈現系統性病徵。當全株都呈現病徵，以核酸探針去偵測時，除莖、葉、花、果實外，地下的根部亦可測得病原，雖含量略有差別，但差別不大，表示病原依維管束組織的分布通達植株各部位。當植株發病經過一段時間後，病原在寄主植物體內的生長漸趨向一個穩定狀態，即病原濃度漸漸達到平衡。但這平衡點會隨季節變動，於五、六月間及十月是病原濃度高峰期，而冬季病原濃度低，二月時病原濃度最低。而木蝨族群消長的高峰期則較病原濃度的高峰期約提早一個月。不論病原濃度高峰期與木蝨族群高峰期是否有直接關係，都顯示這段期間是防治立枯病的關鍵時期。從每年三、四月開始，即應注意防治媒介昆蟲，當然最好在此之前能進行一次全面性的立枯病病原偵測，尤應注意鄰近病株外表健康的植株是否爲已帶病的病株，將其徹底清除以減少感染源。因此若能在病原濃度高的時期做好媒介昆蟲防治，減少媒介昆蟲獲得病原與傳染病原的機會，進而可降低傳播率。而冬季病原濃度低，植株萌芽少，木蝨也較少，是病原傳播率較低的季節，只需有效的防治木蝨，以減低春芽期蟲口數，即可控制立枯病。所以依據媒介昆蟲及病原隨季節消長變化的情形，明確的釐定一年防治計劃及施行重點，將可達到最佳的防治效率。

誌　謝

本研究承行政院農委會82科技－2.3－糧03(3)、83科技－2.4－糧27(2) 及84科技－2.4－糧23(4－3)，經費補助，謹此致謝。

參考文獻

1. 林秀貞、柯永發、陶家駒。1973。柑橘木蝨之生態觀察及其防除試驗。中國園藝 19(4): 234－242。
2. 洪挺軒。1994。柑橘黃龍病原擬細菌診斷用核酸探針之製備與應用於感染生態研究。國立台灣大學植物病蟲害學研究所博士論文253頁。
3. 徐素芬、王仲文、張傳。1994。雲南柑橘木蝨的發生規律及防治研究。浙江柑橘 1:32－33。
4. 許長藩、李升本、柯沖、廖錦澤。1985。木蝨傳播柑橘黃龍病及電鏡檢驗報告。植物病理學報 15(4)：241－245。
5. 黃秋雄。1979。柑橘立枯病病原在罹病柑橘樹之分布。中華農業研究 28:29－33。
6. 黃秋雄、張清安。1980。菌質與麻豆文旦立枯症兆發生關係之研究。中華農業研究 29：13－19。
7. 黃秋雄。1988。柑橘立枯病媒介蟲傳播試驗之過去與現況。柑橘試驗研究成果專題研討會專集 P.169－178。台灣省農業試驗所特刊第27號。
8. 黃秋雄、廖春福、張春蕉、藍　調。1990。柑橘立枯病之發生、蔓延與木蝨族群消長關係之研究。植保會刊 32:167－176。
9. 黃麗華、肖啓明、董俊瑀、李一農、毛曉林。1992。湖南柑橘木蝨發生規律及防治研究。中國柑橘 21(4):36－37。
10. 蔡雲鵬、黃明道、王惠娟。1984。寄生月橘之柑橘木蝨。植保會刊 26:285－287。

11. Catling, H. D. 1978. Citrus psylla *Trioza erytreae* (Del Guercio) In:E. C. G. Bedford (ed.),Citrus pests in the Republic of South Africa. Dep. Agric. Tech. Serv. Sci. Bull. S. Afr. 391, Preskor printers:Pretoria p.71 – 75.

12. Catling, H. D. 1973. Notes on the biology of the South African citrus psylla, *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Homoptera:Psyllidae) J. Entomol. Soc. South Afr. 36:299 – 306。

13. Garnier, M., N. Daniel,and J. M. Bove. 1984. The greening organism is a Gram negative bacterium. In:S. M. Garnsey et.al.(ed.).Proc. 9th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol. p.115 – 124. Univ. Calif. Riverside.

14. Garnier, M., G. Martin – Gros,and J. M. Bove. 1987. Monoclonal antibodies against the bacterial – like organism associated with citrus greening disease. Ann. Inst. Pasteur / Microbiol. 138:639 – 650.

15. Huang, C. H., M. J. Chen,and R. J. Chiu. 1980. Separation of a mycoplasma like organism from the likubin complex in citrus. plant Dis. 64:564 – 566.

16. Huang, C. H., M. Y. Tsai and C. L. Wang.1984. Transmission of citrus likubin by a psyllid, *Diaphorina citri*. J. of Agric. Res. of China 33:65 – 72.

17. Huang, A. L.and H. J. Su.1987. Electronmicroscopical studies on the morphology and population dynamic of fastidious bacteria causing citrus likubin. ph.D. thesis published by National Taiwan University, Taiwan.

18. Matsumoto, T., M. C. Wang,and H. J. Su.1961. Studies on Likubin. p.121 – 125, In: Prooceeding of the second Conference of the International Organiization of Citrus Virologists. W. C. Price (ed.),University of Florida, Gainesville.

19. Matsumoto, T. and H. J. Su. 1966. Likubin or Huanglungpin, citrus virus disease closely related to Tristeza (I).J. Agric. Assoc. China, New Series 56:1 – 12.

20. Mcclean, A. P. D. and R. E. Schwarz. 1970. Greening or Blotch mottle disease of citrus. Phytophylactica 2:177 – 195.

21. Miyakawa, T. 1980. Experimentally – induced symptoms and host range of citrus likubin (greening disease) in Taiwan, mycoplasma – like organisms, transmitted by *Diaphorina citri*. Nihon Shokubutsu Byori Gakkaiho Ann. phytopathol. Soc. Jap. 46 (2): 224 – 230.

22. Su, H. J. and S. C. Leu. 1972. Study on the pathogen complex causing likubin of citrus in Taiwan. I. Nature of mycoplasma like organism associated with the disease. Proc. Natl. Sci. Council. 5:109 – 126.

23. Samways, M. J. and B. Q. Manicom. 1983. Immigration, frequency distributions and dispersion pattern of the psyllid *Trioza erytreae* (Del Guercio) in a citrus orchard. J. Appl. Ecol. 20:463 – 472.

24. Wallace, J. M. 1978. Virus and Viruslike Diseases P.131 – 140. In : Walter, R., E. C. Calavan and G. E. Carman (ed.) The Citrus Industry Vol. IV. Division of Agri. Sci. University of California Berkeley, CA.

Population Fluctuation of *Diaphorina citri* Kuwayama and Its Transmission in Likubin-infected Citrus Orchards in Chia-Yi Area

Liy-yuan Wang[1] *Shi-cheng Hung*[1] *Chung-jo Lin*[2] *Ting-hsuan Hung and*[3] *Hong-ji Su*[3]

[1] Respectively Assistant and Assistant researchers, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment station, TARI, Chiayi, Taiwan, R.O.C.

[2] Horticulturist, Department of Horticulture, Chiayi Agricultural Experiment station, TARI, Chiayi, Taiwan, R.O.C.

[3] Respectively Ph. D. and Professor, Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

Summary

The psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama has been recognized as a vectorial insect of citrus likubin for a long time in Taiwan. Investigation on population dynamics of the psyllid in citrus orchards was showed that the population of adults had three peaks per year which were coincided with the period of citrus flushing at spring, summer and autumn. The number of adults was most abundance in the first population peak and followed by the second peak appearing in summer and the least in the third peak appearing in autumn. As the space distribution of the adults in the field was referring to the Relative Degree of Aggregation(RDA) , the index of RDA went up during the flushing period when the adults aggregated on the new shoots to lay eggs. The index went up to the highest when the adult emerged completely, then it fell down with the dispersion of adults. Newly emer-ging adults were not so active, most of them dispersed by climbing within the same trees and sucked juice from down surface of leaves. Migration of adults around citrus orchard was mostly from March to the end of April. During this period the adults could be trapped by yellow sticky traps set in the rice field or other fruit orchards located in several hundreded meters away from the tested citrus orchard. While the adults immigrated into a new citrus orchard, they multiplicated rapidly and spread to other trees. About 70% of citrus plants could be recorded to be infested by the psyllid four month after if the insect was not control with insecticides during the period from March to May. The incubation period for infected plants to the appearance of likubin symptom was more than one year. The dissemination of likubin in the field from the primarily infected plants to the surrounding plants, which might not show any symptom within one year, could be detected by using dot hybridization (DH) test cooperated with DNA

probe . The same technique could be also used to detect the distribution and variation of greening organism, the causal agent of likubin, in the infected plants. It was showed that the greening organism distributed unevenly in the partially symptom-appearing plants in the early infected period and their density lowered in the tissues with the distance far from the infection point. However, the greening organism distributed near evenly in all organs of the diseased plant after appearance of typical symptoms. The density of the causal agent varied seasonally with high peaks in late spring (May to June) and late autumn (October) , but low in winter. The psyllids on citrus plants was also clarified as a vec-torial insect of liku-bin by DH test. But the percentage of viruliferous vectors was very low. This indicated that affinity between the biotype of *Diaphorina citri* in Taiwan and greening organism was low. However, high diseased rate would be expected in the field due to accumulation of natural infection for a long time period.

Key words: Likubin, *Diaphorina citri* Kuwayama, Population dynamics, DNA probe.